

**ANTITUMOR AGENT**

Patent Number: JP62252730  
Publication date: 1987-11-04  
Inventor(s): OTSU KOICHIRO; others: 01  
Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD  
Requested Patent: ☐ JP62252730  
Application Number: JP19870006318 19870114  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K37/02  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PURPOSE:**An antitumor agent having high antitumor action, alleviating or preventing side effects, obtained by blending an interleukin 2 activator with a specific glucan as active ingredients.  
**CONSTITUTION:**An antitumor agent containing a blend obtained by combining interleukin 2(IL-2 for short) with a straight-chain beta-1,3-glucan (e.g. sizofilan) which may contain glucose residue by beta-1,6-bond as a side chain, a partial hydrolyzate or a carboxymethylated substance thereof. Both IL-2 and the glucan have been used as an antitumor substance, a method of increasing dose is applied to raise antitumor effects, but manifestation of side effects such as pyrexia, headache, rash, etc., is sometimes found. Use of both the substances raises antitumor effects and alleviates side effects. In the antitumor substance, both the substances are blended and applied as one drug or may be separately or simultaneously administered or in a time lag.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-252730

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 37/02

識別記号  
ADU

庁内整理番号  
8615-4C

④ 公開 昭和62年(1987)11月4日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑮ 特 願 昭62-6318

⑯ 出 願 昭62(1987)1月14日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)1月16日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭61-7554

⑲ 発 明 者 大 津 紘 一 郎 大阪府三島郡島本町東大寺3丁目9番26号  
⑲ 発 明 者 後 藤 義 一 大阪府豊能郡豊能町光風台5丁目6番地の11  
⑲ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地  
⑲ 代 理 人 弁理士 岩 田 弘

明 細 書

1. 発明の名称

抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

インターロイキン-2 活性物質と、 $\beta$ -1,6-結合によるグルコース残基を側鎖として有しているもよい直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化物とを組合せてなる抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新規抗腫瘍剤に関する。

従来技術

近作、インターロイキン-2(以下、「IL-2」と略称することもある。)などのいわゆるリンホカインを用いて免疫増強を計り、腫瘍や各種のウイルス感染症を治療する試みが行われている[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 125, 1904(1980)]。上述の高分子タンパク質であるインターロイキン-2は、遺伝子工

学的手法を駆使して、高純度のものが大量に、しかも比較的安価に生産されるようになった[特開昭60-115528号公報]。

一方、直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンは、アルカリゲネス菌もしくはアグロバクテリウム菌に属する微生物が産生する直鎖 $\beta$ -1,3-結合を結合様式として有する水不溶性、加熱凝固性のグルカンであり(TAK-Nと略称されている)、それを部分的に加水分解した低重合体(TAK-Dと略称されている)や、それらのカルボキシメチル化誘導体(CMTAKと略称されている)は、抗腫瘍作用を有することが知られている[特開昭53-66442号公報]。

また、 $\beta$ -1,6-結合によるグルコース残基を側鎖として有している直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン、たとえば担子菌スエヒロタケ(Schizophyllum commune)の培養液から得られたシゾフィラン(sizofilan)は、抗腫瘍剤として用いられている。

発明が解決しようとする問題点

抗腫瘍効果を高めるために、上記薬物の投与量を増加するなどの方法が知られているが、反面、発熱、頭痛、発疹など種々の副作用の発現等により、大量投与による治療は困難である。

#### 問題を解決するための手段

本発明者らは、IL-2の抗腫瘍剤としての応用開発を行っている途中、IL-2を、 $\beta$ -1,6-結合によるグルコース残基を側鎖として有していてもよい直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化物と併用することにより抗腫瘍作用が高まり、単独使用では得ることができない強い抗腫瘍作用を示し、また上記副作用等を軽減もしくは防止しうることを見出し、さらに鋭意研究を行い本発明を完成した。

本発明は、インターロイキン-2活性物質と、 $\beta$ -1,6-結合によるグルコース残基を側鎖として有していてもよい直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化物とを組み合わせる抗腫瘍剤である。

93093号公報]でもよい。

また上記IL-2は、ポリエチレングリコール誘導体等で化学修飾されたもの[例えば特開昭60-226821号公報]でもよい。

とりわけ、本発明においては第1図で示されるアミノ酸配列を有するヒトIL-2を用いるのが好ましく、この場合そのアミノ末端にさらにメチオニン残基(Met)を有するものと有さないものの混合物[特開昭60-115528号公報]であってもよいが、とりわけアミノ末端にMetを有さずアラニン(Ala)で始まるもの[特開昭60-205873号(昭和60年9月17日出願)明細書、特開昭61-78799号公報に対応。]が好ましい。

本発明に用いられる多糖類の中で、直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンとしては、特公昭43-7000号、同48-32673号、同48-32674号および英国特許第1352938号に記載されたTAK-Nが挙げられる。直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンの部分加水分解物としては、特開昭53-

上記インターロイキン-2活性物質は、IL-2活性、すなわちT細胞をその機能を維持したまま維持しうる作用を有する物質であればいずれでもよい。

例えば動物体内や動物細胞で産生される天然のIL-2や遺伝子組み換え技術で産生されるIL-2やこれらの関連物質が挙げられる。上記IL-2やこれらの関連物質は、蛋白質である場合、糖鎖を有していてもよくまた有さなくてもよい。

具体的には、例えば第1図で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド(ヒトIL-2)や、その生物学的もしくは免疫学的活性に必要な一部分のアミノ酸配列からなるフラグメントでもよく、例えば、カルボキシル末端部分の数個のアミノ酸を欠くフラグメント[特開昭60-126088号公報]などが挙げられ、さらに第1図で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの構成アミノ酸の一部が欠損しているか他のアミノ酸に置換されたもの、例えば125位のシスティン残基がセリン残基に置換されたもの[特開昭59-

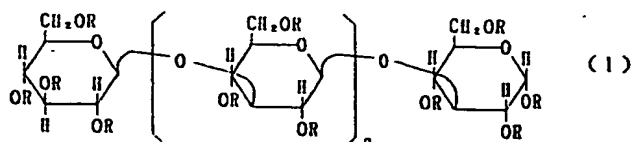
66442号公報に記載のTAK-Dが挙げられる。直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンのカルボキシメチル化物および直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンの部分加水分解物のカルボキシメチル化物としては、特開昭53-66442号公報に記載のCM-TAKが挙げられる。

TAK-Nは直鎖 $\beta$ -1,3-結合を結合様式として有し、水に不溶性で、多くのものは水分と共に加熱するとゲル化して凝固するという他の $\beta$ -1,3-グルカンにはみられない特性を有し、その重合度は製造法の違いによって変動しうるが、マナーズらの方法[カーボハイドレート・リサーチ(Carbohydrate Research), 17, 109(1971)]で測定した場合に平均重合度が約70~1000、とりわけ約400~700のものが有利に用いられる。

TAK-Dは、上記TAK-Nを、たとえば酸加水分解、アルカリ加水分解もしくは $\beta$ -1,3-グリカナゼなどによる酵素加水分解に付すことにより製造され、その平均重合度は原料TAK-

Nのそれより当然小さいが、平均重合度約5～300とりわけ約50～200のものが有利に使用できる。

CMTAKは、TAK-NまたはTAK-Dを、たとえばモノクロル酢酸と反応させるなど通常の糖類をカルボキシメチル化するための手段により製造され、式



[式中、Rの少なくとも1個は $-\text{CH}_2\text{COOH}$ を、残基があればHを示し、nは0または正の整数を示す。]で表わすこともできる。

またCMTAKは各種塩基との塩、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム塩など生理学的に許容される塩であってもよい。

公昭42-12000号公報、特開昭52-57335号公報、台糖研究所報告23.77(1965)、GANN, 60, 137~144(1969)、米国特許第3,987,166号公報参照。]。その構造は、特開昭52-57335号公報、米国特許第3,987,166号公報に記載のものが挙げられる。

本発明で用いられる $\beta-1,6$ -結合によるグルコース残基を側鎖として有している直鎖 $\beta-1,3$ -グルカンの部分加水分解物： $\beta-1,6$ -結合によるグルコース残基を側鎖として有している直鎖 $\beta-1,3$ -グルカンもしくはその部分加水分解物のカルボキシメチル化合物は、前記した直鎖 $\beta-1,3$ -グルカンもしくはその部分加水分解物をカルボキシメチル化する場合と同様に製造することができる。

本発明における1L-2活性物質と、 $\beta-1,6$ -結合によるグルコース残基を側鎖として有しているよい直鎖 $\beta-1,3$ -グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化

CMTAKの平均重合度は、原料として用いたTAK-NもしくはTAK-Dと同一であり、その好ましい態様も同様である。またCMTAK中のカルボキシメチル基含量は、分子中のグルコース残基1個あたり3個以内のものが好ましい。

本発明においては、直鎖 $\beta-1,3$ -グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化物の中でも、とりわけ直鎖 $\beta-1,3$ -グルカンのカルボキシメチル化物が有利に用いられ、またその平均重合度約400～700のものがとりわけ好ましい。

本発明に用いられる $\beta-1,6$ -結合によるグルコース残基を側鎖として有している直鎖 $\beta-1,3$ -グルカンとしては、たとえばシゾフィラン(sisofyllan)が挙げられる。

シゾフィランは、担子菌の一種スエヒロタケ(Schizophyllum commune Fries)の菌糸体の培養液から得られる多糖類であり、 $\beta-1,3$ -結合をなす直鎖状のグルコース残基に $\beta-1,6$ -結合を介してグルコースが分枝している[特

物(以下これらを「グルカン類」と総称することがある)とを組合せてなる抗腫瘍剤は低毒性であるので、安全に使用することができる。

たとえば、特開昭60-115528号公報に記載の方法で得られた1L-2の最小致死量(MLDs)は10mg/マウス以上(1mg=3.5×10<sup>4</sup>units/mg)(腹腔内投与)である。また、グルカン類は毒性が低く、例えばTAK-N、TAK-DおよびCMTAKの毒性はきわめて低く、たとえば急性毒性試験においてマウスあるいはラットに経口投与および腹腔内投与した時のLD<sub>50</sub>値はそれぞれ5g/kg以上、2g/kg以上であり、シゾフィランのマウスにおけるLD<sub>50</sub>は腹腔内投与で2000mg/kg以上、静脈内投与で300mg/kg以上である。

本発明における1L-2活性物質とグルカン類との使用量は、その使用方法、使用目的などにより異なるが、1L-2活性物質のタンパク質量1mcg(1L-2活性として35ユニット(U)、なお1L-2活性の測定に関して特開昭60-

115528号公報抄録。i ユーット(U)は、28.6 mcgの純粋な組換え型IL-2のIL-2活性に相当する。)に対し、グルカン類約0.5 mcg～1000 mcgの割合で用いることが望ましく、とりわけ約50 mcg～400 mcg用い、経口的または非経口的に投与する。

また本発明の抗腫瘍剤の投与量は、使用するIL-2グルカン類の種類によって異なるが、一般的に、温血哺乳動物(例、マウス、ネコ、犬、牛、羊、ヤギ、ウサギ、ヒト)に対して、IL-2のタンパク量を基準として、注射剤として投与する際には、マウスには約0.1～500 mcg、マウス以外の哺乳動物には約0.001～4 mcgが、坐剤として投与する際には、約0.01～20 mcg/kgが、点滴剤として投与する際には、約0.001～2 mcg/kgが、経皮吸収剤として投与する際には、約0.2～4 mcg/kgが、それぞれ好ましい。

本発明の製剤を注射剤として調製するには、担体として、たとえば、蒸留水、生理食塩水、ヒト血清アルブミン含有生理食塩水などが挙げられる。

にそれぞれ別途製剤化したものを、別個に同時にまたは時間差をおいて同一対象に投与することもできる。

本発明の抗腫瘍剤は、哺乳動物の腫瘍の治療または予防に有用であり、例えば腫瘍を保持する哺乳動物の延命に著効を奏する。かかる対象疾病としては各種白血病、悪性リンパ腫、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性絨毛上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、肝癌、胃ならびに腸などの消化器癌、肺癌、食道癌、頸頭部腫瘍、脳腫瘍などが挙げられる。

#### 実施例

以下の実験例および実施例により、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

なお、以下の実験例1～3および実施例1.2で用いられたIL-2は、エシェリキア・コリ(Escherichia coli) DII1/pTF4(IFO 14299, FERMBP-628)を用いて製造されたものである(特開昭60-115528号公報)。

薬剤として調製するには、担体として、たとえば、飽和トリグリセライド、水素添加トリグリセライド、ゼラチン、グリセリン、ポリエチレングリコールモノステアレートなどが挙げられる。

点滴剤として調製するには、担体として、たとえば、蒸留水、生理食塩水、硫酸デキストラン水溶液などが挙げられる。

経皮吸収剤として調製するには、担体として、たとえば、グリセリン、ラウリル硫酸ナトリウムなどの油性基剤、ポリエチレングリコール油性基剤、白ろうなどが挙げられる。

本発明の製剤を製造するにあたっては、通常用いられる常套手段が採用される。

本発明のIL-2活性物質とグルカン類とを組合せてなる抗腫瘍剤は、上記2物質を、公知の製剤学的製造法に準じ、所望により製剤学的に許容される担体(希釈剤、賦形状を含む。)などを用い、混合して一剤となし投与できる。またそれぞれの物質を別途製剤化し用時希釈剤等を用いて一剤となして投与することができる。さらに上記のよう

以下の実施例3および4で用いられたIL-2(A1a分子種)は、エシェリキア・コリN4830/pTB285(IFO 14437, FERMBP-852)を用い、IL-2を遊生させ、さらにアミノ末端がA1aである分子種に分離されたものである(特開昭61-78799号公報の明細書実施例5)。

以下の実験例1.2および実施例1.3で用いられたカルボキシメチル化直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン(CMTAK)は、平均重合度540の直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンをモノクロル酢酸と反応させ、ナトリウム塩として得たものである[特開昭53-66442号公報]。

次の実験例3および実施例2.4で用いられたシゾフィランは、スエヒロタケ(Schizophyllum commune Fries)の菌糸体の培養液から得られ、直鎖 $\beta$ -1,3-グルカンに $\beta$ -1,6-結合によるグルコース残基を側鎖として有しており、重量平均分子量は約45万である(科研製薬株式会社製)。

## 実験例1 (皮下投与による抗腫瘍作用)

体重約20gの雌のBALB/cマウスの側腹部皮下に $1 \times 10^6$ 個のMeth-A線維肉腫細胞(Meth-A腫瘍細胞)を注射筒を用いて移植し、腫瘍移植後7日目に腫瘍が一定の大きさに達したものを選別群分けを行い薬物投与を開始した。薬物投与は腫瘍移植部位とは反対側の側腹部の皮下に1日1回連続10日間行った。薬物はいずれも正常マウス血清を5%添加した生理食塩水(溶解液)に溶解し、投与液量として0.1ml/20gマウス体重となるよう一剤として調製した。抗腫瘍効果の評価は腫瘍移植後21日目の腫瘍重量を測定し、各実験群の平均腫瘍重量を求め、薬物投与群(T,一群5匹)と薬物無処理対照群(C,一群5~10匹)との腫瘍重量比(T/C%)を求めて行った。なお、薬物の1日当りの投与量はマウス1匹当りの薬物重量(mcg)で表わした。IL-2単独投与ならびに本発明のIL-2とカルボキシメチル化直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン(CMTAK)からなる抗腫瘍剤を投与した結果は第1表のとおりである。

日目に腫瘍重量を測定し各実験群の平均腫瘍重量を求め、薬物投与群(T,一群5匹)と薬物無処理対照群(C,一群10匹)との腫瘍重量比(T/C%)を求め抗腫瘍効果の評価を行った。IL-2単独投与ならびに本発明のIL-2とカルボキシメチル化直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン(CMTAK)からなる抗腫瘍剤を投与した結果は第2表のとおりである。なお、薬物の1日当りの投与量はマウス1匹当りの薬物重量(mcg)で表わした。

第2表

投与量 (mcg/ マウス/日)	動物 数	腫瘍重量 (mg) 平均±SD	腫瘍 重量比 (T/C%)	体重 増加(g) (7日-17日)
IL-2 CMTAK (匹)				
無投与対照	15	3.532±1.183		3.0
溶解液(対照)	5	2.650± 363	75	1.7
10 0	5	1.999± 709	57	1.3
10 200	5	1.179± 718	33	1.6

第1表

投与量 (mcg/ マウス/日)	動物 数	腫瘍重量 (mg) 平均±SD	腫瘍 重量比 (T/C%)	体重 増加(g) (7日-21日)
IL-2 CMTAK (匹)				
無投与対照	15	7.092±1.352		4.2
溶解液(対照)	5	7.074±2.011	100	4.2
10 0	5	3.376± 975	48	1.3
10 200	5	2.273±1.435	32	0.9

## 実験例2 (静脈内投与による抗腫瘍作用)

体重約20gの雌のBALB/cマウスの側腹部皮下に $1 \times 10^6$ 個のMeth-A腫瘍細胞を注射筒を用いて移植し腫瘍移植後7日目に腫瘍が一定の大きさに達したものを選別群分けを行い薬物投与を開始した。薬物投与は1日1回連続10日間マウスの尾静脈より行った。薬物はいずれも正常マウス血清を5%添加した生理食塩水(溶解液)に溶解し、投与液量として0.2ml/20gマウス体重となるよう一剤として調製した。腫瘍移植後17

## 実験例3 筋肉内投与による腫瘍作用

体重約20gの雌のBALB/cマウスの側腹部内皮下に $1 \times 10^6$ 個のMeth-A腫瘍細胞を移植し、腫瘍移植後7日目に腫瘍が一定の大きさに達したものを選別群分けを行い薬物投与を開始した。薬物投与は大腿部筋肉内に1日1回連続10日間行った。薬物はいずれも正常マウス血清を5%添加した生理食塩水(溶解液)に溶解し、投与液量として0.1ml/20gマウス体重となるよう一剤として調製した。抗腫瘍効果の評価は腫瘍移植後21日の腫瘍重量を測定し、各実験群の平均腫瘍重量を求め、薬物投与群(T,一群5匹)と薬物無処理対照群(C,一群10匹)との腫瘍重量比(T/C%)を求めて行った。なお、薬物の1日当りの投与量はマウス1匹当りの薬物重量(mcg)で表わした。IL-2単独投与ならびに本発明のIL-2とシゾフィランとからなる抗腫瘍剤を投与した結果を第3表に示す。

表 3 表

投与量 (mcg/ マウス/日)	動物 数	腫瘍重量 (mg) 平均±SD	腫瘍 重量比 (T/C%)	体重 増加(g) (7日-21日)
IL-2 シゾフィラン	(匹)			
無投与対照	9*	5.313±0.902		2.7
溶解液(対照)	5	5.446±6.25	100	3.7
0 400	5	4.688±0.423	88	2.4
10 0	4	2.058±0.294	39	0.3
10 200	5	0.866±0.862	16	0
10 400	5	1.118±0.808	21	0.1

\* 10匹中一匹は剖検前日に腫瘍死した。

## 実施例1 (注射用製剤)

カルボキシメチル化 $\beta$ -1,3-グルカン(平均 重合度540)(CM-TAK)	160mg
ソルビット	200mg
カルボキシメチルセルローズ・ナトリウム	10mg
IL-2	30mg
計	400mg

IL-2 (Ala 分子種)	30mg
計	400mg

上記の割合で、四者を混合したのち注射用蒸留水に溶解し無菌的に1mlずつバイアル瓶に分注して凍結乾燥し、注射用抗腫瘍剤を調製する。本注射用製剤は、用時注射用蒸留水1mlに溶解する。

## 実施例4 (注射用製剤)

シゾフィラン	160mg
ソルビット	200mg
カルボキシメチルセルローズ・ナトリウム	10mg
IL-2 (Ala 分子種)	30mg
計	400mg

上記の割合で、四者を混合したのち注射用蒸留水に溶解し無菌的に1mlずつバイアル瓶に分注して凍結乾燥し、注射用抗腫瘍剤を調製する。本注射用製剤は、用時注射用蒸留水1mlに溶解する。

## 発明の効果

本発明のIL-2活性物質と、 $\beta$ -1,6-結

上記の割合で、四者を混合したのち注射用蒸留水に溶解し無菌的に1mlずつバイアル瓶に分注して凍結乾燥し、注射用抗腫瘍剤を調製する。本注射用製剤は、用時注射用蒸留水1mlに溶解する。

## 実施例2 (注射用製剤)

シゾフィラン	160mg
ソルビット	200mg
カルボキシメチルセルローズ・ナトリウム	10mg
IL-2	30mg
計	400mg

上記の割合で、四者を混合したのち注射用蒸留水に溶解し無菌的に1mlずつバイアル瓶に分注して凍結乾燥し、注射用抗腫瘍剤を調製する。本注射用製剤は、用時注射用蒸留水1mlに溶解する。

## 実施例3 (注射用製剤)

カルボキシメチル化 $\beta$ -1,3-グルカン(平均 重合度540)(CM-TAK)	160mg
ソルビット	200mg
カルボキシメチルセルローズ・ナトリウム	

合によるグルコース残基を側鎖として有していてもよい直鎖 $\beta$ -1,3-グルカン、その部分加水分解物もしくはそれらのカルボキシメチル化物とを組合せてなる抗腫瘍剤は、それぞれの単独使用では得ることができない強い抗腫瘍作用を奏し、副作用も少ないので、抗腫瘍剤として有利に用いることができる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明で使用するIL-2のアミノ酸配列の一例を示す。

代理人 弁理士 岩 田 弘



<sup>1</sup>  
 Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln  
<sup>20</sup>  
 Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn  
 Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met  
<sup>40</sup>  
 Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu  
<sup>60</sup>  
 Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro  
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe  
<sup>80</sup>  
 His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val  
<sup>100</sup>  
 Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met  
 Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe  
<sup>120</sup>  
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser  
<sup>133</sup>  
 Thr Leu Thr